



THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Appl. No. : 10/734,583  
Applicant : ANDOU et al.  
Filed : December 15, 2003  
TC/A.U. : 3738  
Examiner : Not Yet Assigned

Docket No. : 2923-595  
Customer No. : 06449  
Confirmation No. : 2600

~~THIS PAGE BLANK (USPTO)~~

**SUBMISSION OF PRIORITY APPLICATION**

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, Virginia 22313-1450

**BEST AVAILABLE COPY**

Dear Sir:

Submitted herewith is a certified copy of European Patent Application No. 99115613.4 filed August 6, 1999 and Japanese Patent Nos. JP 8/355812 filed December 25, 1996 and JP 10/141379 May 22, 1998, from which priority has been claimed in the above-referenced patent application.

Respectfully submitted,

By

Steven M. Giovannetti  
Attorney for Applicants  
Registration No. 51,739  
ROTHWELL, FIGG, ERNST & MANBECK, p.c.  
Suite 800, 1425 K Street, N.W.  
Washington, D.C. 20005  
Telephone: (202)783-6040

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 1996年12月25日

出願番号  
Application Number: 平成 8年特許願第355812号  
[ST. 10/C]: [JP1996-355812]

出願人  
Applicant(s): アベンティス ファーマ株式会社

CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

BEST AVAILABLE COPY

2004年 4月22日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫

【書類名】 特許願  
【整理番号】 DOJ-4950  
【提出日】 平成 8年12月25日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 A61K 37/02  
C07K 1/14  
【発明の名称】 精製された骨誘導因子二量体の製造方法  
【請求項の数】 5  
【発明者】  
【住所又は居所】 埼玉県川越市南台1丁目3番地2 日本ヘキスト・マリオン・ルセル株式会社バイオ医薬品開発センター内  
【氏名】 本田 淳  
【発明者】  
【住所又は居所】 埼玉県川越市南台1丁目3番地2 日本ヘキスト・マリオン・ルセル株式会社バイオ医薬品開発センター内  
【氏名】 安藤 英俊  
【発明者】  
【住所又は居所】 埼玉県川越市南台1丁目3番地2 日本ヘキスト・マリオン・ルセル株式会社バイオ医薬品開発センター内  
【氏名】 杉本 俊二郎  
【特許出願人】  
【識別番号】 596124690  
【氏名又は名称】 日本ヘキスト・マリオン・ルセル株式会社  
【代表者】 マーク・デュノワイエ  
【代理人】  
【識別番号】 100091731  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 高木 千嘉  
【電話番号】 03-3261-2022

## 【代理人】

【識別番号】 100087930

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 佐藤 辰男

## 【代理人】

【識別番号】 100080355

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 西村 公佑

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015565

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9606221

【書類名】 明細書

【発明の名称】 精製された骨誘導因子二量体の製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 遺伝子工学的方法により產生された骨誘導因子の封入体を下記工程a)～e)に順次付して骨誘導因子二量体を得ることを特徴とする精製された骨誘導因子二量体の製造方法。

- a) 骨誘導因子封入体を変性剤で処理して可溶化単量体を得る工程、
- b) 得られた可溶化単量体をリフォールディング溶液で処理して骨誘導因子二量体を得る工程、
- c) リフォールディングした骨誘導因子二量体を塩析分画処理する工程、
- d) 塩析分画した骨誘導因子二量体を等電点沈殿処理する工程、
- e) 等電点沈殿処理した骨誘導因子二量体を逆相クロマトグラフィー処理する工程。

【請求項2】 前記封入体が、遺伝子工学的方法により大腸菌に発現させた骨誘導因子の封入体である請求項1に記載の製造方法。

【請求項3】 変性剤終濃度が1～4Mである請求項1または2に記載の製造方法。

【請求項4】 リフォールディング溶液が、システイン、塩化ナトリウム、およびCHAPSからなる緩衝液であり、そのpHが8～10の範囲である請求項1から請求項3のいずれかの項に記載の製造方法。

【請求項5】 骨誘導因子が、MP52、BMP-2、BMP-4、BMP-6、BMP-7からなる群から選択されたいずれか1つの骨誘導因子である請求項1乃至請求項4のいずれかの項に記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、精製された骨誘導因子二量体の製造方法に関する。さらに詳しくは、本発明は遺伝子工学的方法により產生された骨誘導因子の封入体から精製された骨誘導因子二量体を得ることを特徴とする骨誘導因子二量体の製造方法に関する

る。

### 【0002】

#### 【従来の技術】

骨基質に蛋白性の骨誘導因子が存在することが発見され (Science 150, pp. 89 3-899, 1965) 、bone morphogenic protein (以下 BMP と略す) と命名された。近年、複数の BMP 関連遺伝子がクローニングされ、いずれもトランスフォーミング成長因子- $\beta$  (以下 TGF- $\beta$  と略す) スーパーファミリーに属していることが知られている。これらのうち、いくつかは遺伝子工学による組換体が生産され、それを用いて骨誘導活性が確認され、骨疾患治療への応用が期待されている。

### 【0003】

それらの内、最近発見されたヒト由来の BMP ファミリーに属する GDF-5 (MP52) (Biochem. Biophys. Res. Commun. 204, pp. 646-652) は動物実験により骨誘導因子として有効であることが確認され、また遺伝子組み換え大腸菌による発現で大量に生産する技術が試みられている。しかし大腸菌等に大量に発現させた場合、例えば、1リットル培養液中数グラム蛋白質を産生させた場合、目的蛋白質は一般に不活性な不溶性の封入体 (顆粒体、inclusion body) を形成しがちである。この封入体は単量体であり、骨誘導因子として活性のある二量体を得るにはこの封入体を可溶化し、本来の構造である二量体に再生 (一般にリフォールディング (refolding) と呼ばれる操作) し、分離・精製を行ない目的の蛋白質を得る必要がある。

### 【0004】

MP52 の活性型は、

- 1) 水溶液中の溶解度が低く、変性剤存在下あるいは酸性条件下で扱わなくてはならないこと、
- 2) 分離に使われる蛋白質が液体クロマトグラフィー用担体に非特異的に吸着すること、
- 3) リフォールディング時に不可欠な界面活性剤が分離の際の障害になること、等の問題を抱えており精製法の確立は困難を極めた。

### 【0005】

上記を解決するために最近開発された精製法 (WO 96/33215) では、

1. 封入体を変性剤で可溶化する工程、
2. イオン交換クロマトグラフィーによる分離工程、
3. スルホン化工程、
4. ゲルろ過クロマトグラフィーによる分離工程、
5. リフォールディング工程、
6. 等電点沈殿による回収工程、
7. 逆相クロマトグラフィーによる分離工程、

の各工程を経て単一の活性型MP52を得ている。

### 【0006】

しかしこの方法を工業的規模に拡大するには、

- 1) MP52封入体を可溶化するための変性剤を多量に消費すること、またそれによる蛋白質の修飾（たとえば、尿素の場合であればカルバミル化反応）を誘発すること、
- 2) クロマトグラフィーの担体、特にゲルろ過クロマトグラフィーにおいては例えばセファクリルS-200HR、スーパーデックス200pg（いずれもファルマシアバイオテク製）のような高価なものを大量に使用すること、
- 3) リフォールディングの際に使用する試薬、とりわけ二量体化反応に欠かせないCHAPSと酸化型グルタチオンが非常に高価であること、

等の問題がある。

### 【0007】

#### 【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は上記の問題を解決すること、即ち

- 1) 変性剤の使用を極力抑える、
- 2) クロマトグラフィー担体の使用量を極力抑える、
- 3) リフォールディングの際に使用する試薬を他の安価なものに置き換えること、およびこれらに付随する操作の簡略化すなわち、時間の大幅短縮にある。

### 【0008】

### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、大腸菌から抽出した封入体を変性剤存在下で可溶化させたのち、希釈操作でリフォールディングを直接行ない、次いで塩析分画することにより、精製工程の簡略化を可能にした。この手法は大腸菌からヒトインスリンを製造する方法（EP 6003725）の最初の工程に類似するが、骨誘導因子の場合はヒトインスリンのような水溶性蛋白質とは性質が異なるため、上記インスリン製造方法をそのまま骨誘導因子に応用するのは困難であった。大量に生産する場合には前述のように二量体化したMP52（活性型）は溶解度が低く、またクロマトグラフィー担体に吸着する性質を持つため、ヒトインスリンで使用するイオン交換や疎水クロマトグラフィーあるいは前記WO96/33215で使用するゲルろ過クロマトグラフィーは使用できない。例えばイオン交換（ファルマシアバイオテク、SP Sepharose FF）を用いた場合、変性剤を使用しても担体への吸着が強く、MP52は完全に溶出されない。ゲルろ過（ファルマシアバイオテク、Sephacryl S-200HR）を用いた場合、変性剤を使用しても担体への吸着が強く、分画範囲が極端に広くなってしまい分離が非常に悪い。また、CHAPSの影響により担体の性質が変化し、再現性がなくなる。MP52が溶解しうる酸性溶液による溶出についても同様で、結論として担体本来の性質を生かして使用することができない。

### 【0009】

以上のように、一般の水性系クロマトグラフィーの方法では大量生産の場合目的蛋白質の精製が行えないことが明らかとなった。唯一利用出来たのは有機溶媒を用いた逆相クロマトグラフィーのみであったため、カラムを多用しない精製法を開発する必要があった。カラム以外の精製法としてはpH調節による等電点沈殿法の他に、塩析による溶解度の違いを利用した分画法を取り入れた。

### 【0010】

本発明は、遺伝子工学的方法により產生された骨誘導因子の封入体を下記工程a)～e)に順次付して精製された骨誘導因子二量体を得ることを特徴とする骨誘導因子二量体の製造方法からなる。

a) 骨誘導因子封入体を変性剤で処理して可溶化単量体を得る工程、

- b) 得られた可溶化单量体をリフォールディング溶液で処理して二量体を得る工程、
- c) リフォールディングした二量体を塩析分画処理する工程、
- d) 塩析分画した二量体を等電点沈殿処理する工程、
- e) 等電点沈殿処理した二量体を逆相クロマトグラフィー処理する工程。

#### 【0011】

遺伝子工学的方法により產生された骨誘導因子の封入体としては、遺伝子工学的方法により大腸菌に発現させたものが好ましい。

#### 【0012】

骨誘導因子を大腸菌に発現させた場合、菌体を緩衝液に懸濁し、菌体破碎装置で破碎し、遠心分離により封入体を回収する。封入体を洗浄成分含有バッファー、例えば、Triton X-100、または尿素で3回以上洗浄後、遠心分離を行い粗精製された封入体を得る。

#### 【0013】

骨誘導因子封入体を変性剤で処理して可溶化单量体を得る工程は、封入体を変性剤を含む溶液に加え、攪拌して溶解させることによって実施される。変性剤を含む溶液としては、従来公知のもの、例えば、8M尿素または6M塩酸グアニジンなどを含む50mMグリシン-水酸化ナトリウムバッファー(pH10.7)などが用いられる。

#### 【0014】

可溶化单量体をリフォールディング溶液で処理して二量体を得る工程は、上で得られた单量体の溶液をリフォールディング溶液で5~50倍、好ましくは10倍に希釈することによって実施される。従来、変性剤の終濃度が1M以下となるように希釈されていたが、本発明においては、変性剤の終濃度が1~4M、特に2.4Mとなるように希釈するのが蛋白質の凝集、沈殿を防ぎ、収率を向上させるので好ましい。リフォールディング溶液としては、従来公知のもの、例えば、CHAPSなどの界面活性剤；EDTA；メルカプトエタノールもしくはDTTなどの還元剤と酸化型グルタチオンとの組み合わせまたはシステインなどを含む緩衝液が用いられる。緩衝液としては、リン酸、トリス塩酸を用いた緩衝液を使

用することもできるが、pH 8～10、特に8.9のグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液が好ましい。CHAPS濃度は後の等電点沈殿工程における希釈率に影響を与えるのでCHAPS濃度を20mM程度にすることにより、収率を低下させることなく等電点希釈率を最小にすることができる。

#### 【0015】

リフォールディングした二量体を塩析分画処理する工程は、リフォールディング終了後、リフォールディング溶液に塩類、例えば硫酸アンモニウムを10～30%飽和、好ましくは25%飽和まで加え、1時間以上放置することにより実施される。塩類が溶解した後、遠心分離またはろ過を行い、沈殿を除いて上清を採取する。

#### 【0016】

塩析分画した二量体を等電点沈殿処理する工程は塩析分画でえられた上清を蒸留水で6倍以上に希釈し、pHを7.4に調節し、骨誘導因子を選択的に沈殿させることにより実施される。希釈により界面活性剤であるCHAPSの濃度が下がり沈殿の量が増加する。pH調節後溶液を1時間以上放置し、遠心分離またはろ過し、上清を除き、沈殿を酸溶液例えば50mMクエン酸、0.2%磷酸溶液または0.05%トリフルオロ酢酸に溶解する。

#### 【0017】

等電点沈殿処理した二量体を逆相クロマトグラフィー処理する工程は、上で得られた酸性溶液を高圧液体クロマトグラフィーにかけ、有機溶媒、例えばイソプロパノール、アセトニトリル、エタノール0～55%のグラジエンドで溶出させ、骨誘導因子の二量体の分画を採取することにより実施される。高圧液体クロマトグラフィーの担体としては高分子系担体、例えばRESOURCE RPC (6.4mmφ×100mm, ファルマシアバイオテク社製) が用いられる。

#### 【0018】

本発明における骨誘導因子としては、MP52、BMP-2、BMP-4、BMP-6、あるいはBMP-7からなる群から選ばれるいずれか一つの単一な分子量からなる骨誘導因子が好適に使用される。例えばヒトMP52前駆体をコードするcDNAを導入した大腸菌株（具体的には成熟型MP52のN末端のアラ

ニンを削除した119残基よりなるMP52配列の5プライム末端にメチオニンをコードするコドンを結合させたプラスミドを導入した大腸菌)を用い、それを培養し、成熟型MP52単量体を封入体として多量に生産させ、その封入体より本発明の製法を用い高純度の成熟型MP52を得ることができる。

### 【0019】

#### 【実施例】

次に、実施例を示して本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明は以下の実施例により限定されるものではない。操作はタンパク質の安定性を考慮し(2)から(4)までは4℃の低温室で行う。それぞれの工程の内容を以下に記す。

##### (1) ヒトMP52の培養と封入体の粗精製

WO96/33215の実施例2と同様にして得られたMP52産生大腸菌を改变SOC培地で前培養した後、生産用培地100Lに前培養液を植菌する。対数増殖前期に1mMのイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)を添加し誘導をかけ、OD550=150まで32℃で培養行う。その後集菌を行い、菌体を25mMトリス塩酸(pH7.3)、10mM EDTA・4Naを含む緩衝液に懸濁し菌体破碎装置(マントン・ゴーリン社製)で破碎し、遠心分離によって封入体を回収する。封入体を洗浄成分含有バッファー1% Triton X-100で3回以上洗浄の後、遠心分離を行い粗精製された封入体を得る。

##### (2) 封入体の可溶化とリフォールディング

上記により得られた封入体の湿重量2gを8M尿素を含む50mMグリシン-水酸化ナトリウムバッファー(pH10.7)20mLに攪拌・溶解させる(MP52濃度は約18mg/mL)。この封入体溶解液をリフォールディング・バッファー[50mMグリシン-水酸化ナトリウム(pH8.9)、0.5mM塩酸システィン水和物、0.5M塩化ナトリウム、20mM CHAPS、0.2mM EDTA]に10倍希釈してリフォールディングを行なう。この際、リフォールディング・バッファー中の変性剤終濃度を2.4Mに調整する。このまま4℃で20時間程度放置する。

##### (3) リフォールディング後のMP52の精製(塩析分画)

リフォールディング反応が終了したMP52の最初の精製操作として塩析分画

を行う。リフォールディング反応液に硫酸アンモニウムを25%飽和(144g/L)まで少しづつ添加する。添加後穏やかに攪拌しながら1時間以上放置し溶解を待つ。溶解後、遠心分離(15000g×20min)を行い、沈殿を廃棄して上清を次の工程へ運ぶ。

(4) リフォールディング後のMP52の精製(等電点沈殿)

硫酸分画で得られた上清を蒸留水で6倍以上に希釈し、pHを7.6に調節することによりMP52を選択的に沈殿させる。pH調節後1時間以上放置し、遠心分離(15000g×20min)を行う。上清を廃棄し、沈殿を50mMクエン酸に溶解する(約0.8mg/mL)。

(5) リフォールディング後のMP52の精製(逆相クロマトグラフィー)

酸性溶液に溶解したMP52を逆相クロマトグラフィーにて分離をおこなう。担体としてRESOURCE RPC(6.4mmφ×100mm, ファルマシアバイオテク)を用い、高圧液体クロマトグラフィー装置で運転し、エタノール0~55%のグラジェントで溶出させ、MP52の二量体の分画を回収する。各分画を電気泳動後銀染色を行う。銀染色は第一化学薬品(株)のゲルおよび銀染色キットを使用し、サンプルバッファー(非還元)10μL+サンプル15μLを55℃で10分間加熱後各レーンにアプライした。このときの溶出パターンを図1に示し、各分画の電気泳動パターンを図2に示す。図2ではフラクションLは逆相クロマトグラフィーにアプライする前のサンプルであり、フラクションMは分子量マーカーを示す。ここでMP52 PDCとはWO96/33215により得られた成熟型MP52の標準品を意味する。フラクション1~17は目的の成熟型MP52二量体を示す。フラクション45は目的MP52以外の生産物、すなわちリフォールディングによりMP52二量体とともに副産物として生成するMP52様のもの、例えば共有結合されたMP52二量体、修飾されたMP52二量体、およびMP52の多量体等が含まれている。すなわち、目的MP52以外のものはこの逆相クロマトグラフィーで分離可能なことが明らかである。

【0020】

以上の精製法により、表1に示す高収率で活性型MP52を回収することに成功した。各工程のMP52量は抽出工程に関しては電気泳動ゲルのCBB染色画

像走査定量法により、リフォールディング工程以降は逆相高速液体クロマトグラフィーによる定量により求めた。

### 【表1】

工 程	MP52量 (mg)	収率 (%)
抽出	336	100
リフォールディング	140	42
塩析分画	108	32
等電点沈殿	80	24
逆相クロマトグラフィー	60	18

### 【0021】

さらに、各工程における電気泳動パターンを図3に示す。左のレーンから、分子量マーカー、封入体を変性剤で可溶化したもの、リフォールディング・バッファーにより希釈したもの、リフォールディング後のもの、塩析分画後のもの、等電点沈殿後のもの、そして逆相クロマトグラフィーで精製したものである。この電気泳動パターンより、最終的に銀染色のレベルでほぼ単一のMP52二量体が回収できていることが明らかである。

### 【0022】

本工程のメリットの一つとして、精製にかかるコストの削減効果があげられる。試算によるとWO96/33215と比較して原料（試薬等）で約1/2、資材（カラム担体等）で約1/5、合計でプロセスコストが1/3程度までに下がるため、工業化するにあたり、非常に有益な精製法である。

### 【0023】

#### 【発明の効果】

本発明の製造方法によれば、単一な分子量からなる骨誘導因子二量体が効率よく、大量に、しかも従来法と比較して安価に产生することができる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【図1】

逆相クロマトグラフィーの溶出パターン（クロマトグラム）である。

#### 【図2】

図1の溶出パターンにおける各画分の電気泳動パターンの写真である。

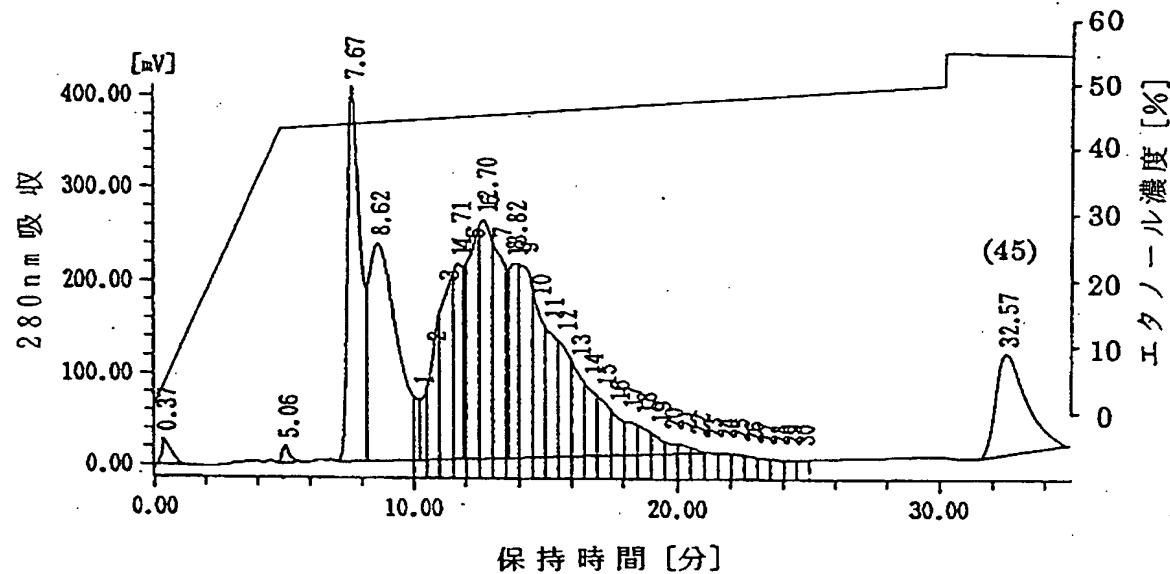
【図3】

各精製工程におけるMP52溶液の電気泳動パターンの写真である。

【書類名】

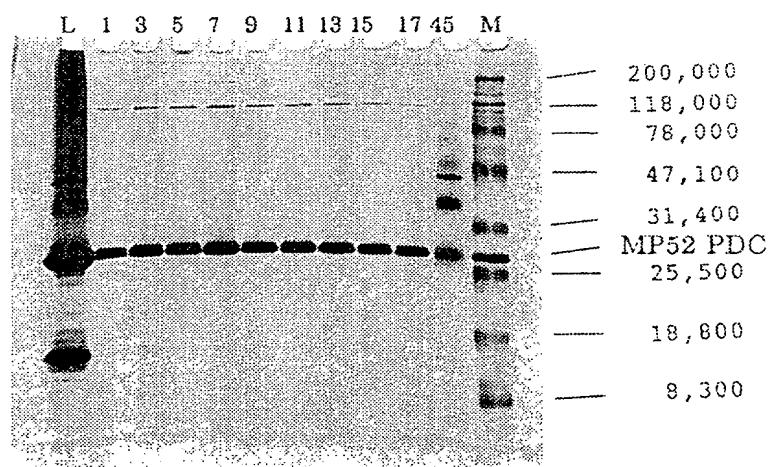
図面

【図1】

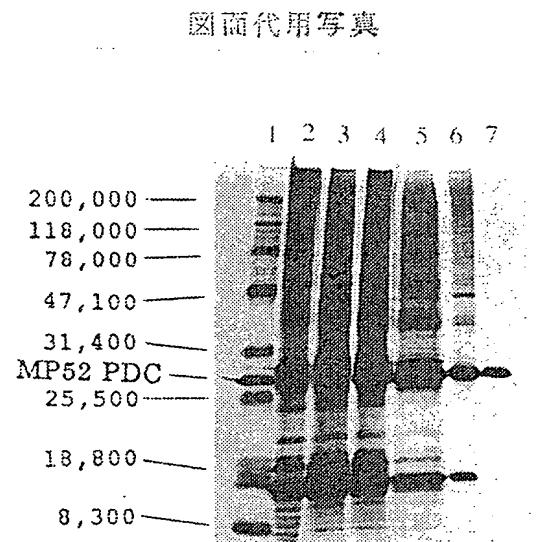


【図2】

図面代用写真



【図3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 精製された骨誘導因子二量体の製造方法。

【解決手段】 遺伝子工学的方により產生された骨誘導因子の封入体を下記工程 a) ~ e) に順次付すことにより精製された骨誘導因子二量体が得られる。

- a) 骨誘導因子封入体を変性剤で処理して可溶化单量体を得る工程、
- b) 得られた可溶化单量体をリフォールディング溶液で処理して骨誘導因子二量体を得る工程、
- c) リフォールディングした骨誘導因子二量体を塩析分画処理する工程、
- d) 塩析分画した骨誘導因子二量体を等電点沈殿処理する工程、
- e) 等電点沈殿処理した骨誘導因子二量体を逆相クロマトグラフィー処理する工程。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

## 【特許出願人】

【識別番号】 596124690

【住所又は居所】 東京都港区赤坂二丁目17番51号

【氏名又は名称】 日本ヘキスト・マリオン・ルセル株式会社

## 【代理人】

【識別番号】 100091731

【住所又は居所】 東京都千代田区麹町一丁目10番地 麹町広洋ビル  
すばる特許事務所

【氏名又は名称】 高木 千嘉

## 【代理人】

【識別番号】 100087930

【住所又は居所】 東京都千代田区麹町一丁目10番地 麹町広洋ビル  
すばる特許事務所

【氏名又は名称】 佐藤 辰男

## 【代理人】

【識別番号】 100080355

【住所又は居所】 東京都千代田区麹町一丁目10番地 麹町広洋ビル  
すばる特許事務所

【氏名又は名称】 西村 公佑

特願平08-355812

## 出願人履歴情報

識別番号 [596124690]

1. 変更年月日 1996年 8月23日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 東京都港区赤坂二丁目17番51号  
氏 名 日本ヘキスト・マリオン・ルセル株式会社

2. 変更年月日 1998年 1月26日  
[変更理由] 名称変更  
住 所 東京都港区赤坂二丁目17番51号  
氏 名 ヘキスト・マリオン・ルセル株式会社

3. 変更年月日 2000年 2月 1日  
[変更理由] 名称変更  
住 所 東京都港区赤坂二丁目17番51号  
氏 名 アベンティス ファーマ株式会社